

DOI: 10.7251/VETJ1502251K

UDK 636.2.084.1

**З. Ковачевић<sup>1</sup>, Д. Стојановић<sup>1</sup>, Б. Белић<sup>1</sup>, Н. Плавша<sup>1</sup>, М. Цинцовић<sup>1</sup>, И. Давидов<sup>1</sup>, Михајло Ердељан<sup>1</sup>***Оригинални рад*

## УТИЦАЈ КЕТОПРОФЕНА НА БРОЈ НЕУТРОФИЛНИХ ГРАНУЛОЦИТА И ЛИМФОЦИТА У РАНОЈ ЛАКТАЦИЈИ КОД КРАВА

### Кратак садржај

Проналажење решења за смањење учесталости здравствених проблема и инфламације током периода ране лактације је важно. Кетопрофен се свакодневно користи у ветеринарској пракси против инфламације. Циљ студије је био да се утврди утицај апликације кетопрофена на број неутрофилних гранулоцита и лимфоцита у крви крава. Истраживање је спроведено на 30 крава. Огледној групи је апликован кетопрофен у дози од 3 мг/кг т.м. Узорци крви су узети три пута. Примећено је смањење броја неутрофилних гранулоцита и лимфоцита у крви млечних крава током периода ране лактације којима је апликован кетопрофен у односу на контролну групу што може бити последица антиинфламаторног ефекта кетопрофена.

**Кључне речи:** кетопрофен, инфламација, неутрофили, лимфоцити, крава

**Z. Kovacevic<sup>1</sup>, D. Stojanovic<sup>1</sup>, B. Belic<sup>1</sup>, N. Plavska<sup>1</sup>, M. Cincovic<sup>1</sup>, I. Davidov<sup>1</sup>, M. Erdeljan<sup>1</sup>***Original paper*

## THE EFFECT OF KETOPROFEN ON NUMBER OF NEUTROPHILS AND LYMPHOCYTES IN EARLY LACTATION COWS

### Abstract

Finding solutions to reduce the incidence of health problems and inflammation during the early lactation is important. Ketoprofen widely used in veterinary practice

1 Пољопривредни факултет Нови Сад, Департман за ветеринарску медицину, Трг Доситеја Обрадовића 8, 21000 Нови Сад, Република Србија  
Faculty of Agriculture, Novi Sad, Department of Veterinary Medicine, Bulevar Cara Lazara 8, 21000, Novi Sad, Republic of Serbia  
Е-пошта коресподентног аутора / E-mail of the Corresponding Author: [zorana.kovacevic@polj.edu.rs](mailto:zorana.kovacevic@polj.edu.rs)

against inflammation. The aim of this study was to determine the effect of the application of ketoprofen to the number of neutrophils and lymphocytes in the blood of cows. The study was conducted on 30 cows. Experimental group was administered ketoprofen in a dose of 3 mg/kg B.W. Blood samples were taken three times. It has been observed reduction in the number of neutrophils and lymphocytes in the blood of dairy cows during the period of early lactation ketoprofen which was applied as compared to the control group which may be due to an anti-inflammatory effect of ketoprofen.

**Key words:** *ketoprofen, inflammation, neutrophils, lymphocytes, cows*

## УВОД / INTRODUCTION

Млечне краве имају развијен снажан имунолошки систем који штити организам ових животиња од страних патогена или штетних стимулуса, а чине га урођени и стечени имунитет. Урођени имунитет обезбеђује почетни, неспецифични одговор на патогена и његове компоненте су леукоцити, цитокини, еикосаноиди, као и неимунолошке ћелије, као што су епителне и ендотелне ћелије (Sordillo и сар., 2009). Стечени имунитет је више специфичан одговор који настаје када инфективни агенс није елиминисан путем урођеног имунолошког одговора (Janeway и сар., 2005). Током транзиционог периода све краве пролазе кроз неки степен инфламације. Инфламација представља одговор живог ткива на ендogene и екзогене штетне патогене. Адаптација крава води до негативних последица путем ефеката који потичу од медијатора, углавном цитокина и еикосаноида (Bionaz и сар., 2007; Sordillo и сар., 2009).

Еикосаноиди су физиолошки активни метаболити арахидонске ки-

селине. До сада су позната два главна пута метаболизма ове киселине: циклооксигеназни пут у ком се образују простагландини, тромбосани и простациклини уз помоћ ензима циклооксигеназе и липооксигеназни пут у ком се образују леукотриени под дејством липооксигеназа (Miller, 2006; Ricciotti и Fitzgerald, 2011).

Постоји много начина на које различити поремећаји током транзиционог периода код крава могу да покрену инфламаторни одговор. Заразне болести, као што су метритис и маститис, покрећу непосредно акутни инфламаторни одговор у борби против патогена (Hotamisligil, 1993). На лабораторијском моделу сепсе у строго контролисаним условима је такође показано да постоје бројне метаболичке и инфламаторне адаптације. Карактеристике наведених помена су следеће: повећана концентрација проинфламаторних цитокина, повећање броја леукоцита са променом у диференцијалној белој лози, промене у концентрацији глукозе и другим параметрима који указују на функционални статус јетре и бубрега (Стојановић, 2009;

Стојановић и сар., 2012; Стојановић и сар., 2013).

Први леукоцити који доспевају на место инфламације су неутрофилни гранулоцити (Girard, 2003) и њихова апоптоза је важна за процес инфламације (Kam и Ferch, 2000), јер немогућност да се подвргну овом облику ћелијске смрти доводи до повећања оштећења ткива и погоршања инфламаторног одговора тако да утицај неутрофилних гранулоцита на стопу апоптозе може имати терапијски значај.

С друге стране, повећана концентрација проинфламаторних цитокина може у значајној мери да утиче на метаболичко престројавање у раној лактацији, потенцирајући настанак метаболичког стреса и липидне мобилизације и кетогенезе (Sordillo и сар., 2009).

Проналажење решења за смањење учесталости здравствених проблема и озбиљност инфламације током периода ране лактације је важно. Нестероидни антиинфламаторни лекови (НСАИЛ) се свакодневно користе у ветеринарској клиничкој пракси против инфламације. Инхибиција COX-2 од стране НСАИЛ је одговорна за механизам деловања ових лекова, односно одговорна је за већину њихових терапијских деловања, као што су периферна и централна аналгезија, антиинфламаторни ефекат, антипиретички ефекат и анти-ендотоксични ефекат, док инхибиција COX-1 изазива нежељена деловања као што су улцерација гастроинтестиналне муко-

зе и нефропатија (Laven и сар., 2012; Fitzpatrick и сар., 2004).

Као НСАИЛ, кетопрофен је у широкој употреби у ветеринарској медицини, јер су позната његова снажна аналгетска, антипиретичка и антиинфламаторна својства (Lees и сар., 2004). Кетопрофен је регистрован за следеће индикације, то су терапија инфламаторних и болних стања костију и зглобова и мишићно-зглобног система код крава, коња, паса и мачака, као и за симптоматско лечење колика код коња и крава (ЕМЕА, 1995).

Banting и сар. (2008) су показали да је значајно бољи ефекат на инфламаторне процесе и контракције бурага забележен након оралне (4 мг/кг телесне масе) и интрамускуларне примене кетопрофена у дози од 3 мг/кг телесне масе. На основу извршених испитивања Landoni и сар. (2008) закључују да интравенска примена кетопрофена у дози од 3мг/кг телесне масе доводи до инхибиције синтезе еикосаноида, тромбоксана Б2 и простагландина 2. Такође, у сличним испитивањима (Trevisi и сар., 2005; Trevisi и Bertoni, 2008) су доказали да апликација ацетилсалицилне киселине, као НСАИЛ код крава доводи до смањена негативних последица инфламације и последично доводи до повећања количине млека и плодности.

Тако, у испитивању Raare и сар. (1991) је забележено да ацетилсалицилна киселина убрзава фагоцитозу говеђих неутрофила. До сличних резултата се дошло и у

другим испитивањима (*Basi* и сар., 1998), када је такође забележено *in vitro* да аспирин у веома ниским дозама убрзава процесе фагоцитозе изолованих говеђих неутрофила.

Циљ ове студије је био да се утврди утицај апликације кетопрофена на број неутрофилних гранулоцита и лимфоцита у крви млечних крава током периода ране лактације.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ / MATERIAL AND METHODS

За оглед је одабрано 30 крава Холштајн-фризијске расе, старости од 2 до 4 година, у постпарталној фази, без клиничких промена здравственог стања, које су држане у шталским условима са чистом и сувом простирком. Све краве су биле приближне телесне грађе и масе и давале су приближно исту количину млека. Потом је формирана огледна група од 15 крава којој је апликован кетопрофен и контролна група која је представљала негативну контролу, тј. није јој апликован кетопрофен. Кетопрофен је апликован

интрамускуларно, у терапијској дози, 3 мг/кг телесне масе, током три дана после тељења.

Узорци крви су узимани из репне вене (*vena cossugea*) на дан тељења, и у првој и другој недељи после партуса. Узети су узорци пуне венске крви са EDTA за хематолошке анализе. Одређивање броја неутрофилних гранулоцита и лимфоцита у крвном серуму је вршено на хематолошком аналајзеру *Hemavet 950* са софтвером за говеда. Закључци и евалуација су изведени коришћењем софтвера Microsoft Word 2007.

## РЕЗУЛТАТИ / RESULTS

Број неутрофилних гранулоцита и лимфоцита у крвном серуму је измерен код 30 узорака. Резултати броја неутрофилних гранулоцита у крвном серуму огледне и контролне групе крава на дан тељења и у првој и другој недељи после тељења налазе се у Табели 1, док се резултати броја лимфоцита налазе у Табели 2.

**Табела 1.** Број неутрофилних гранулоцита у крвном серуму огледне и контролне групе крава

Група	n	Број неутрофилних гранулоцита ( $\times 10^9/l$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )		
		0 недеља	1 недеља	2 недеља
Огледна	15	3.8 $\pm$ 0.23	3.5 $\pm$ 0.19	3.3 $\pm$ 0.26
Контролна	15	3.7 $\pm$ 0.24	3.6 $\pm$ 0.22	3.8 $\pm$ 0.25**

<sup>1</sup>значајност разлике вредности испитаних параметара крви код крава које су примале и које нису примале кетопрофен \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

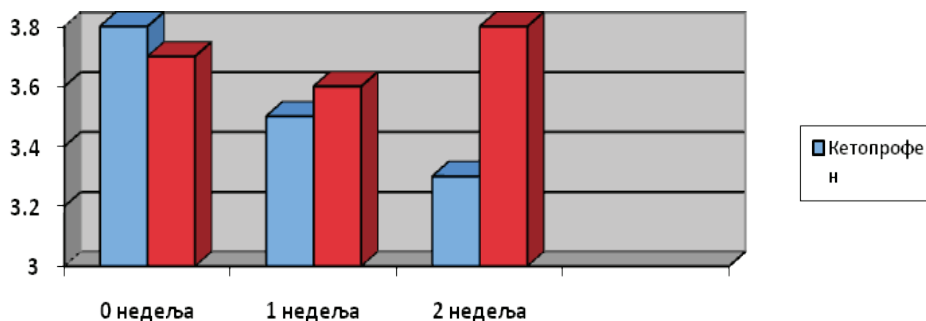
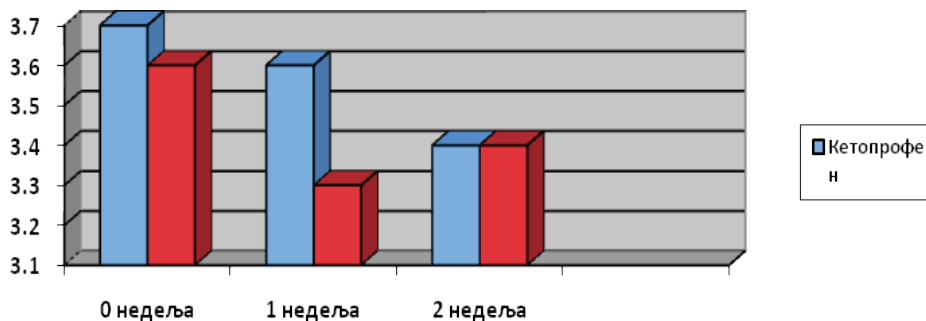
**Табела 2.** Број лимфоцита у крвном серуму огледне и контролне групе крава

Група	n	Број лимфоцита ( $\times 10^9/l$ ) ( $\bar{X} \pm SD$ )		
		0 недеља	1 недеља	2 недеља
Огледна	15	$3.7 \pm 0.16$	$3.6 \pm 0.15$	$3.4 \pm 0.12$
Контролна	15	$3.6 \pm 0.18$	$3.3 \pm 0.6^{**}$	$3.4 \pm 0.15$

<sup>1</sup>значајност разлике вредности испитаних параметара крви код крава које су примале и које нису примале кетопрофен \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$

Резултати броја неутрофилних гранулоцита у крвном серуму групе крава која је примала кетопрофен и групе крава која није примала кетопрофен

на дан тељења, у првој и другој недељи после тељења налазе се на Графикону 1, док се резултати броја лимфоцита налазе на Графикону 2.

**Графикон 1.** Број неутрофилних гранулоцита огледне и контролне групе крава**Графикон 2.** Број лимфоцита огледне и контролне групе крава

## ДИСКУСИЈА / DISCUSSION

У перипарталном периоду долази до опадања укупног броја леукоцита што слаби одбрамбене способности организма (*Klinkon и Zadnik, 1999*). Такође, разне метаболичке и хормоналне промене које се дешавају у овом периоду могу умањити функцију неутрофила и лимфоцита (*Kehrli и сар., 1989*).

Краве које имају прекомерну липидну мобилизацију и кетогенезу, као и смањене концентрације глукозе имају знатно већи однос медијатора запаљења попут неутрофила и лимфоцита (*Белић и сар., 2011; Mirzadeh и сар., 2010*).

Током процеса инфламације, први леукоцити који доспевају на место инфламације су неутрофилни гранулоцити (*Girard, 2003*). Ови нагомилани неутрофилни гранулоцити требало би да буду безбедно уклоњени. Апоптоза неутрофила је важна за процес инфламације, односно има важну улогу у елиминацији неутрофила са места инфламације (*Kam и Ferch, 2000*). Немогућност неутрофила да се подвргну овом облику ћелијске смрти доводи до повећања оштећења ткива и погоршања инфламаторног одговора. Самим тим, утицај неутрофилних гранулоцита на стопу апоптозе може имати терапијски значај.

Апликација НСАИЛ доводи до смањења броја неутрофилних гранулоцита на месту инфламације и изазивања апоптозе што су *Vasilev и сар. (2006)* потврдили у свом раду. Они су доказали да аспирин након 24 сата инкубације на 37°C са неутрофилима

у концентрацијама у распону од 100 до 2500 М, значајно инхибише апоптозу ових ћелија. То је и потврђено у нашој студији где је услед апликације кетопрофена дошло до смањења концентрације неутрофилних гранулоцита као последица деловања овог лека на сам процес апоптозе неутрофила, утичући на смањење њихове концентрације.

На основу извршених испитивања *Landoni и сар. (2008)* су потврдили антиинфламаторни ефекат кетопрофена након интравенске примене у дози од 3 мг/кг телесне масе. Такође, у сличним испитивањима, *Banting и сар. (2008)*, значајно бољи ефекат на инфламаторне процесе и контракције бурага је забележен након оралне (4 мг/кг телесне масе) и интрамускуларне примене кетопрофена у дози од 3 мг/кг телесне масе.

Такође, смањење броја неутрофилних гранулоцита у овом истраживању у другој недељи код крава третираних кетопрофеном у односу на контролну групу може се повезати са антиинфламаторним ефектом кетопрофена и слична је резултатима *Bertoni и сар., (2008)*.

Према *Trevisi и сар. (2005)* пораст укупног броја леукоцита (како неутрофила, тако и лимфоцита) непосредно пре тељења код крава третираних ацетилсалицилном киселином потврђује инфламацију у овом периоду. У свом раду (*Paape и сар., 1991*) су забележили да ацетилсалицилна киселина као НСАИЛ у веома ниским дозама убрзава фагоцитозу говеђих неутрофила што



је потврђено и у нашем истраживању где је код огледне групе крава дошло до пада боја неутрофила. Стимулативно деловање ацетилсалицилне киселине на имуни систем је потврђено и у студији Bas и сар. (1998) што одговара резултатима нашег истраживања.

## ЗАКЉУЧЦИ / CONCLUSIONS

На основу резултата истраживања је примећено смањење броја неутрофилних гранулоцита у крви млечних крава током периода ране лактације којима је апликован кетопрофен у односу на контролну групу што може бити последица антиинфламаторног ефекта кетопрофена и његовог утицаја на изазивање апоптозе. Дошло је и до пада броја неутрофила код огледне групе крава што може бити последица антиинфламаторног ефекта кетопрофена.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Banting A., Banting S., Heinonen K. And Mustonen K. (2008): *Efficacy of oral and parenteral ketoprofen in lactating cows with endotoxin-induced acute mastitis*. Veterinary Record 163: 506-509.
2. Bas A. L., Tras B., Elmas M., Keskin E. And Yazar E. (1998): *The effects of acetylsalicylic acid on the phagocytic function of bovine neutrophils in vitro*. Rev. Med. Vet. 149:857-862.
3. Belic B., Cincovic M.R., Krcmar Lj., Vidovic B. (2011): *Reference values and frequency distribution of hematological parameters in cows during lactation and in pregnancy*. Contemporary agriculture. 60: 145-51.
4. Bertoni G. E., Trevisi X.H. And Bionaz M. (2008): *Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows*. Journal of Dairy Science. 91: 3300 – 3310.
5. Bionaz M., E. Trevisi L. Calamari F. Li-brandi A. Ferrari G. Bertoni. (2007): *Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows*. Journal of Dairy Science. 90:1740–1750.
6. Fitzpatrick J.L., Nolan A.M., Lees P., May S.A. (2004). *Inflammation and pain*. In bovine medicine, Second Ed. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 1045-1066.
7. Girard D. (2003): *Activation of human polymorphonuclear neutrophils by environmental contaminants*, Rev Environ Health, 18, 2, 77-93.
8. Hotamisligil G.S., Shargill N. S. I, Spiegelman B. M. (1993): *Adipose expression of tumor necrosis-factor-alpha - Direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science. 259:87-91.
9. Janeway C. A., Travers P., Walpot M., Shlomchik M. J. (2005): *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 6th ed. Garland Science Publishing, New York, NY.
10. Kam P.C.A., Ferch N.I. (2000): *Apoptosis: mechanisms and clinical implications*, Anaesthesia, 55, 1081-93.
11. Kehrli M. E. Jr., Nonnecke B. J. And Roth J. A. (1989): *Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period*. American Journal of Veterinary Research. 50 (2): 215-220.
12. Klinkon M., Zadnik T. (1999): *Dynamics of red and white blood picture in dairy cows during the periparturient*

- period. Comparative Hematology International*. 9: 156-161.
13. Landoni M.F., Cunningham F.M., Lees P. (2008): *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketoprofen in calves applying PK/PD modeling*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 18(5): 315-324.
  14. Laven R., Chambers P., Stafford K. (2012): *Using non-steroidal anti-inflammatory drugs around calving: Maximizing comfort, productivity and fertility*. The Veterinary Journal 192:8-12.
  15. Lees P., Landoni M.F., Giraudel J., Toutain P.L. (2004): *Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest*. Journal of veterinary pharmacology and therapeutics. 27: 479-490.
  16. Miller S. B. (2006): *Prostaglandins in health and disease: an overview. Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 36 (1): 37-49.
  17. Mirzadeh K.H., Tabatabaei S., Bojarpor M., Mamoei M. (2010): *Comparative study of hematological parameters according strain, age, sex, physiological status and season in Iranian cattle*. J Anim Vet Adv 9(16): 2123-7.
  18. Paape M. J., Miller R. H. and Ziv G. (1991): *Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils*. American Journal of Veterinary Research. 52: 363-366.
  19. Ricciotti E. i FitzGerald G.A. (2011): *Prostaglandins and Inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31(5): 986-1000.
  20. Sordillo M. L., Contrera G.A. And Aitken S. L. (2009): *Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows*. Animal Health Research Reviews 10 (1): 53-63.
  21. Стојановић Д. (2009): *Models of sepsis on laboratory animals*. Naučni insitut za veterinarstvo "Novi Sad" – Novi Sad.
  22. Стојановић Д., Велхнер М., Стојанов И., Петровић Ј., Ашанин Ј., Ковачевић З. (2012): *Biochemical parameters in rats with an applied model of sepsis (cecal ligation and puncture) with pure and mixed bacterial culture*. Acta Veterinaria 62 (5-6): 543-551.
  23. Стојановић Д., Ковачевић З., Жекић М., Ашанин Ј., Ратајац Р., Петровић Ј., Петровић Т., Стојанов И., Велхнер М. (2013): *Examination of enzymes concentration in the rats blood with sepsid caused by mixed and pure bacterial cultures*, Acta Veterinaria 63 (5-6): 609-620.
  24. Trevisi E., And Bertoni G. (2008): *Attenuation with acetylsalicylate treatments of inflammatory conditions in periparturient dairy cows*. In: P. I. Quinn, editor, Aspirin and Health Research Progress. Nova Science Publ., Hauppauge, NY. 22-37.
  25. Trevisi E., Ferrari A., Archetti I., Bertoni G. (2005): *Anti-inflammatory treatments in calving dairy cows: Effects on haematological and metabolic profiles*. Italian Journal of Animal Science 4(2s):203-205.
  26. Vasilev S., Majstorovic I., Gasic S., Vucevic D., Vasilijic S., Cupic V. et al. (2006): *The effects of aspirin on apoptosis of neutrophil granulocytes*, Acta Veterinaria, 56, 5-6, 413-21.